

RELACIONES ANTIGENICAS ENTRE DIFERENTES MUESTRAS DE ECTIMA CONTAGIOSO (ORF) DE MEXICO

JORGE L. TORTORA PEREZ ^{1, 2}

CARMEN GARCIA JIMENEZ ²

RESUMEN

Se examinaron las relaciones antigénicas existentes entre 16 muestras de ectima contagioso (ORF), de diferentes partes de México, colectadas durante distintos brotes en ovinos y caprinos entre 1979 y 1984. Los diagnósticos fueron confirmados por tinción negativa en microscopio electrónico y las relaciones antigénicas se evaluaron mediante las técnicas de doble inmunodifusión en gel (IDD), contraímmunoelectroforesis (CIE) y seroneutralización (SN) en cultivos celulares (células (PK15). En todas las pruebas se empleó un suero hiperinmune de conejo y en las pruebas de precipitación en gel también se ensayaron sueros de cabras (concentrado por diálisis), ovejas y corderos convalescientes de la enfermedad.

En IDD y CIE, con excepción de dos muestras, todas las demás al ser enfrentadas al suero hiperinmune de conejo y al de corderos convalescientes formaron una sola línea de precipitación con respuesta de identidad entre

ellas. No se observaron líneas de precipitación al utilizar los sueros de cabra y ovejas convalescientes. De las dos muestras que no dieron líneas de identidad, una era de origen caprino y otra de ovino, ambas demostraron identidad parcial en IDD y se comportaron como serotipos diferentes al ser evaluadas en SN.

INTRODUCCION

Distintas situaciones apoyan la posibilidad de que existan tanto diferentes serotipos como biotipos del virus del ectima contagioso (EC):

- * Resultados contradictorios al intentar infectar en forma experimental a especies distintas de los ovinos y los caprinos;
- * Diferente susceptibilidad a la enfermedad de cabras y ovejas que se crían en rebaños mixtos;
- * Distinta localización de las lesiones según los brotes;
- * Presentación de la enfermedad en forma recurrente o en animales ya antes vacunados (Buddle y col., 1984a, b; Tórtora, 1985).

Sin embargo, los intentos por demostrar estas diferencias han arrojado información contradictoria, en parte como consecuencia de la utilización de diferente metodología experimental.

1 Depto. de Fisiopatología, Sector Pecuario, INIFAP-SARH, Km. 15.5, Carr. México-Toluca, México, D.F., C.P. 05110.

2 Coordinación Gral. de Investigación y Posgrado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM. Ap. Postal No. 25 Cuautitlán Izcalli Edo. de México, C.P. 54700.

Los primeros ensayos con el empleo de pruebas de protección cruzada, revelaron aparente identidad entre muestras inglesas y australianas (Seddon y McGrath, 1931, citados por Sawhney, 1966a) y entre inglesas, francesas y norteamericanas (californianas) (Glover, 1932, citado por Robinson y Balassu, 1981). Más tarde Sawhney (1966a,b), al utilizar seroneutralización y observar las diferencias en las características del efecto citopático (ECP), concluye que mediante análisis serológico es posible distinguir muestras de diferente origen. A conclusiones similares llegan Precausta y Stellmann (1974), al usar seroneutralización (SN), aunque subrayan el parentesco antigénico de las cinco muestras analizadas.

Sin embargo, en la actualidad se ha demostrado la existencia de diferentes índices de SN, entre muestras de un mismo virus con diferente número de pases (8 y 137) en células de origen bovino (Wittek y col., 1980). El uso de enzimas de restricción en el análisis del genoma (ADN) viral, que es una técnica de mayor sensibilidad para distinguir entre variantes del virus, ha demostrado la existencia de estas últimas incluso dentro de una misma muestra (Wittek y col., 1980; Robinson y col., 1982; Gassmann y col., 1985).

Pese a lo anterior, el conocimiento en torno a la existencia o no de variantes antigénicas del virus, puede ser información de utilidad en términos epidemiológicos y de profilaxis. De hecho las fallas de "vacunación" han sido siempre atribuidas a las diferencias antigénicas entre las cepas, aunque no se ha podido demostrar la relación entre estas diferencias y la protección cruzada entre cepas (Buddle y col., 1984a, b).

Del EC no se han desarrollado vacunas inocuas; la profilaxis de la enfermedad consiste en una técnica

semejante a la variolización, en la que la piel del animal es escarificada con un inóculo preparado con virus obtenido de costras de casos clínicos o bien de cultivos celulares que no atenúan al virus (Robinson y Balassu, 1981; Tórtora, 1985). El uso de esta técnica supone el riesgo de dispersar variantes del virus entre distintas regiones geográficas. En México, este procedimiento es poco empleado, por lo que se consideró de interés evaluar la existencia de posibles variantes antigénicas del virus, tanto por el empleo de muestras de campo en la "vacunación", como por el riesgo potencial de la introducción de nuevas variantes del virus al utilizar vacunas foráneas.

MATERIAL Y METODOS

Se evaluaron 16 muestras de EC, obtenidas en brotes de la enfermedad en diferentes regiones de México, en su mayoría del centro del país, entre 1979 y 1984, en rebaños ovinos, caprinos y mixtos. El diagnóstico de EC se confirmó por la observación en microscopio electrónico de las partículas virales, mediante tinción negativa con fosfotungstato de sodio a pH 7.4 y 60Kw, de los macerados de las costras típicas de la enfermedad. En el Cuadro 1, se resumen las principales características de las muestras estudiadas.

Las costras obtenidas en los distintos casos clínicos fueron maceradas en un mortero Ten Broeck, de tubo y mandril esmerilado de vidrio; se emplearon cantidades variables de costra entre 0.1 y 0.4 g, y para la maceración se utilizó medio de cultivo celular (MEM) adicionado de 2% de antibióticos (200 UI de penicilina y 200 Mg de estreptomina por ml). Primero se emplearon 5 ml de la solución hasta lograr la completa disgregación de la muestra, luego se centrifugó a temperatura ambiente por 10 minutos a

CUADRO 1: Principales características de las muestras de ectima contagioso (orf), empleadas en las pruebas de IDD y CIE.

Muestra N°	Origen	Especie	Localización y características de la lesión.	Fecha del brote
1	B, California S.	caprino	Costras en labios y mucosa oral.	Febrero 1980
2	Edo. de México	ovino	Costras en labios.	Agosto 1979
3	B, California S.	caprino	Papilomatosa en hollares.	Febrero 1980
4	Desconócido	caprino	Aportada por el Lab. Central de Diagnóstico-SARH.	Julio 1980
5	"	"	" " "	" "
6	"	"	" " "	" "
7	Guanajuato	caprino	Costras en labios, periné y en labios vulvares.	Agosto 1980
8	Guerrero	caprino	Costras en labios.	Agosto 1980
9	Edo. de México	ovino	Papilomatosa en labios.	Marzo 1981
10	Edo. de México	ovino	Costras en labios.	Mayo 1981
11	Edo. de México	ovino	Costras en labios.	Junio 1981
12	Edo. de México	ovino	Costras en labios y úlceras en rodete dentario.	Mayo 1981
13	Edo. de México	ovino	Costras en labios.	Enero 1982
14	Guanajuato	caprino	Costras en labios y pezones	Enero 1983
15	Puebla	ovino	Costras en labios.	Mayo 1983
16	Edo. de México	caprino	Costras en labios.	Julio 1984

1000-1200 xg y el sobrenadante se completó a 20 ml con solución de MEM. Los macerados así obtenidos se conservaron a -20°C hasta su utilización como soluciones antigénicas o material infectante de cultivos celulares. Parte de la muestra 1 fue liofilizada, se suspendieron 10 g de la costra antes macerada, en 2.5 l de conservador para liofilización de peptona-sacarosa (fosfato de potasio 2.7 g peptona 20 g, sacarosa 100 g en 1000 ml de agua deionizada), la suspensión se fraccionó en unidades de 2 ml y se conservó terminada la liofilización a 4°C . Esta muestra liofilizada, fue titulada en células BHK-21, clona 13, y demostró el ECP característico del virus del EC en diluciones de hasta 10^{-8} (Tórtora y col., 1982).

Las relaciones antigénicas entre las muestras fueron evaluadas con la utilización de sueros de diferente origen: un suero hiperinmune de conejo preparado con la muestra 1; uno de cabras convalescientes de la enfermedad, sangradas a las tres y cuatro semanas de iniciado el brote del que se obtuvo la muestra 16; uno de ovejas adultas y otro de corderos de un mismo rebaño, sangrados cuatro y cinco semanas después de iniciada la enfermedad; no se realizó la evaluación antigénica de las costras de este brote en este trabajo.

Para la obtención del suero hiperinmune de conejo, se emplearon tres conejos que habían dado respuestas positivas a EC al ser escarificados en el hocico con un inóculo de la muestra 1 y desarrollado las lesiones de pápula-pústula típicas. Después los animales fueron inoculados por vía subcutánea con el liofilizado de la misma muestra, se aplicó en cada caso 1 ml cada semana durante el primer mes, luego cada 15 días durante el segundo y tercer mes y por último los animales fueron sangrados por punción cardíaca

una semana después de la novena aplicación. El suero se clarificó por centrifugación a 1000-1200 xg por 10 minutos, se filtró con membrana millipore de .45 micras y se conservó a -20°C . La titulación del suero se realizó al enfrentar diluciones logarítmicas del mismo de 10^{-1} a 10^{-6} , contra las diluciones 10^{-3} de las muestras 2, 5, 8 y 9, que habían demostrado claro ECP en cultivos primarios de piel de cabra (Torres y col., 1982).

Los sueros de cabra y ovinos fueron procesados y conservados de la misma forma que el suero de conejo. En el caso de suero de cabras, después de varios intentos con resultados negativos en doble inmunodifusión (IDD), se concentró al precipitarlo con sulfato de zinc y luego se dializó en buffer de barbituratos.

La posible existencia de relaciones antigénicas se evaluó primero con las pruebas de precipitación en agarosa: inmunodifusión doble (IDD) y contrainmunolectroforesis (CIE) y después se empleó la técnica de seroneutralización (SN) en cultivos celulares.

El gel de las pruebas de IDD y CIE se preparó con agarosa al 1%, con el empleo de buffer de barbituratos LKB, pH 8.6 ± 0.1 con una fuerza iónica de 0.02. En las pruebas de IDD se utilizaron sistemas de cinco y seis fosetas periféricas de 4 mm de diámetro para los antígenos, con una foseta central de 6 mm de diámetro para el antisuero, con una distancia de 5 mm entre fosetas. Previo a su utilización, el suero de conejo fue adsorbido con un macerado de costras de cabra obtenidas de lesiones traumáticas. Cuando se empleó el suero de conejo, la muestra 1 fue incluida en todos los sistemas como testigo y cuando se utilizó el suero de cabra se incluyó la muestra 16. Los antígenos fueron ensayados sin diluir y a diluciones de 1:2, 1:4 y 1:8. Para correr las pruebas se

llenaron dos veces las fosetas de antígenos y sueros, se incubaron las placas primero 24 horas a temperatura ambiente y después 96 horas a 4°C en cámara húmeda. Las placas se lavaron 24 horas con PBS, después otras 24 horas con agua destilada y al final se colorearon con una solución al 1 por mil de negro amido en una solución de metanol-acético (negro amido 1g, metanol 500 ml, ácido acético 100 ml, agua destilada 400 ml) (Cervantes, 1983).

Las pruebas de CIE se corrieron de acuerdo a la técnica descrita por Cervantes (1983), se emplearon los mismos geles y buffers que en IDD, cada foseta de suero se enfrentó en línea contra dos fosetas de antígeno, todas de 4 mm de diámetro, separadas en ángulo de 45°C y a 6 mm de la del suero. Se aplicó una corriente de 10 mA durante 90 minutos, la migración fue verificada con un colorante de referencia (azul de bromotimol en solución acuosa al 1%). Los antígenos se ensayaron con las mismas diluciones que para IDD y las placas también se lavaron y tificaron con el mismo procedimiento que para IDD.

Las pruebas de SN se realizaron en microplacas de 96 fosetas, de fondo plano para cultivos celulares, sobre células PK15 de alto pasaje (187 pases). En este caso sólo se ensayaron las muestras 8 y 9, que demostraron líneas de precipitación de identidad parcial en IDD y que se obtuvieron

de diferente origen, la primera de origen caprino, de la costa del Estado de Guerrero, a partir de un brote ocurrido en agosto de 1980 y la segunda de origen ovino del Municipio de Zumpango, Edo. de México, obtenida en marzo de 1981. Ambas regiones a una distancia geográfica aproximada de 600 km y sin relaciones de intercambio pecuario entre estas especies.

Los dos macerados fueron probados en diluciones logarítmicas de 10^{-1} a 10^{-8} ; al mismo tiempo se evaluaron estas diluciones que habían sido incubadas por una hora a 37°C con el suero hiperinmune de conejo en su dilución 10^3 . Para tal fin las microplacas se dividieron en forma vertical a la mitad, se utilizaron cinco fosetas para la mezcla de la dilución viral incubada con el suero de conejo y las otras cinco para la dilución viral sin tratar. Las dos hileras de fosetas verticales laterales se mantuvieron sin tratar como control de células (16 fosetas). Las microplacas se leyeron a las 72 horas, en función de la presencia de ECP, los títulos de las diluciones virales se compararon con sus equivalentes incubados antes con el suero de conejo, el título se expresó en TDC_{50} y logaritmo de base 10, calculado por el procedimiento de Reed-Muench (Jawetz y col., 1973).

RESULTADOS

El suero hiperinmune de conejo en su dilución 10^{-3} bloqueó por completo el efecto citopático de las diluciones 10^{-3}

CUADRO 2: Índices de seroneutralización de las muestras 8 y 9, enfrentadas al suero hiperinmune de conejo, calculados por el método de Reed-Muench (Jawetz et al., 1973)

	<u>Virus solo</u>	<u>Virus + Antisuero</u>	<u>Indice</u>	<u>Anti-log.</u>
Muestra 8	$TDC_{50} = 10^{-6.78}$	$TDC_{50} = 10^{-4.23}$	-2.55	00282
Muestra 9	$TDC_{50} = 10^{-5.84}$	$TDC_{50} = 10^{-4.85}$	-0.99	10232

de las muestras de las costras 2,5,8 y 9 mientras que en la dilución 10^{-4} sólo causó el bloqueo parcial del ECP en las células de piel fetal de cabra. Este resultado determinó que el suero de conejo se utilizara a la dilución de 10^{-3} en las pruebas de SN.

En las pruebas de IDD no se observaron líneas de precipitación cuando se utilizaron los sueros de cabra en su forma original y concentrado por diálisis; tampoco con el suero de las ovejas adultas convalescientes. Sin embargo, se obtuvieron resultados positivos al emplear el suero hiperinmune de conejo y el suero de los corderos convalescientes; en ambos casos y con todas las muestras ensayadas, se observó la formación de una sola línea de precipitación. Con los macerados sin diluir, las líneas se formaron en la proximidad de la foseta central del suero, mientras que con las diluciones 1:4 y 1:8, las líneas se establecieron a una distancia equidistante entre la foseta del suero y las de los antígenos, lo cual facilitó la lectura. En todas las muestras las líneas formadas coincidían en los extremos con las de los antígenos vecinos, con las características de las respuestas de identidad antigénica entre muestras; con excepción de las muestras 8 y 9 en que se presentó un desplazamiento de las líneas, propio de las reacciones de identidad parcial.

En las pruebas de CIE, se obtuvieron los mismos resultados que IDD, incluido el hecho de que con ambos sueros sólo se formó una línea de precipitación con todas las muestras ensayadas.

En la prueba de SN sobre células PK15, el suero de conejo en su dilución 10^{-3} determinó una reducción en el ECP de las muestras 8 y 9, el efecto de neutralización fue mayor para la muestra 8 con un índice de -2.55, mientras que con la muestra 9 fue de -0.99. Los

índices de SN establecidos por Reed-Muench y sus diferencias se expresan en el Cuadro 2.

DISCUSION

La prueba de IDD puede ser utilizada con fines de confirmación diagnóstica para detectar la presencia de antígenos del virus del EC en las costras o material sospechoso, como se demostró al emplear el suero hiperinmune de conejo. Esta observación coincide con lo señalado por otros autores (Sawhney y col., 1983; Capurso y col., 1976), en estos casos se recomienda, al igual que para otras pruebas diagnósticas en EC, utilizar costras de las primeras tres semanas de evolución de la enfermedad, con objeto de evitar resultados falsos negativos (Romero-Mercado y col., 1973).

Pese a los resultados positivos con el empleo de suero de corderos, los resultados negativos obtenidos con los sueros de las ovejas y de las cabras, incluso concentrado este último; parecen confirmar que la prueba de IDD es poco confiable si se pretende demostrar con ella la presencia de anticuerpos precipitantes en el suero de los animales enfermos o convalescientes, esto coincide con observaciones de otros autores (Sawhney y col., 1973; Capurso y col., 1976).

Debe destacarse que los sueros de ovejas y cabras resultaron negativos a pesar de que los animales fueron sangrados en el momento en que se esperaban los mayores títulos de anticuerpos circulantes y se ha señalado como factible el uso de la prueba IDD para evidenciarlos en este tipo de cuadros virales (Papadopoulos y col., 1968; Puran Chand y col., 1985).

La prueba de CIE no se ha utilizado con fines diagnósticos en EC. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren los mismos comentarios que

para IDD, con el inconveniente agregado de que esta prueba requiere de un equipo más sofisticado para su realización. La CIE amplía el margen de detección de precipitinas en el suero de animales inoculados con viruela ovina de 5 a 45 días postinoculación, contra el margen de 10 a 30 días demostrado en los mismos animales por IDD (Puran Chand y col., 1985). Sin embargo, debe señalarse que la viruela ovina produce viremia y cuadros sistémicos graves, situación que no se presenta en EC.

Las diferencias anotadas en IDD y CIE entre el suero de los corderos y el de las ovejas del mismo rebaño, en parte puede explicarse por la diferente gravedad y extensión de las lesiones en los animales jóvenes y los adultos; las lesiones son siempre más severas en los animales jóvenes, esto podría determinar una mayor respuesta de anticuerpos circulantes.

El suero hiperinmune de conejo que se utiliza en estas pruebas, puede prepararse en forma directa, tal como se hizo en este trabajo, con el macerado de costras como antígeno, si se tiene la precaución de adsorber después el suero con costras de otro origen, suero de cabra, ovino o tejidos epidérmicos, para evitar respuestas de precipitación inespecíficas (Sawhney y col., 1973; Capurso y col., 1976).

El hecho de que en todas las pruebas de IDD y CIE corridas en este trabajo, sólo se formara una línea de precipitación, tanto con el suero de conejo como con el de corderos convalescientes, parece ser un indicador con la confiabilidad suficiente de que se trató de respuestas específicas a antígenos del virus de EC y de que la adsorción del suero de conejo con costras de origen traumático fue una alternativa eficiente para eliminar las posibles respuestas inespecíficas, en este caso a las proteínas de origen caprino (séricas y tisulares) presentes

en la costra. Sin embargo, debe considerarse la baja sensibilidad de estas pruebas, en particular de IDD.

Las respuestas de identidad en las líneas de precipitación observadas en las pruebas en gel, con la mayoría de las muestras y la de identidad parcial en el caso de las muestras 8 y 9, pueden considerarse como elementos indicadores de que las muestras ensayadas comparten un mismo determinante antigénico y si se considera la baja sensibilidad de la prueba de IDD, puede presumirse que se trata de un determinante mayor. Estos resultados son semejantes a los obtenidos en la India por Sawhney y col., (1973), con 15 muestras de ovinos y caprinos y por Capurso y col., (1976), con nueve muestras ovinas en Italia, ambos grupos emplearon la prueba de IDD en sus trabajos. La demostración de dilución 10^{-9} el efecto citopático de las muestras 2, 5, 8 y 9, es un elemento agregado a la existencia de relaciones antigénicas entre estas muestras, aunque en este caso no se cuantificara dicha relación.

La respuesta de identidad parcial entre las muestras 8 y 9 en las pruebas de precipitación en agarosa, si se considera su baja sensibilidad, sumada a las diferencias observadas en los índices de SN de las mismas, son suficientes elementos para considerarlas como serotipos diferentes. Para los adenovirus se ha establecido que dos muestras con índices SN, separadas por el equivalente a las diferencias existentes en los índices de una dilución doble mayor de 16, deben ser consideradas como serotipos diferentes (Matthews, 1979). Si en este caso se utilizaran diluciones dobles (2, 4, 8, 16, 32...) la diferencia en los índices de SN de las muestras 8 y 9 entraría en la observación anterior, si se considera que el logaritmo de 16 en base 10 es 1.204 y la diferencia obtenida en los antilogaritmos de los índices es de

9.950. Es importante jerarquizar las diferencias de origen geográfico y de especie de estas dos muestras.

Pruebas más sofisticadas como el uso de electroforesis en geles de poliacrilamida, han señalado la existencia de importantes variaciones en la composición peptídica de diferentes muestras de EC, se sugiere que estas variaciones corresponderían a componentes antigénicos del filamento que rodea a la partícula viral y que en consecuencia podrían afectar la respuesta inmune al virus, aunque existan respuestas cruzadas de seroneutralización (Buddle y col., 1984a).

El análisis del ADN viral con enzimas de restricción evidencia fuertes variaciones en la composición del material genético del virus en distintas muestras e incluso en una misma muestra (Robinson y col., 1982; Wittek y col., 1980; Gassmann y col., 1985). Esta técnica además ha permitido demostrar estrechas semejanzas entre los virus aislados en brotes severos de la enfermedad y los utilizados en las vacunas vivas comerciales empleadas en la misma región en los Estados Unidos (Raffi y Burger, 1985).

Si bien en este trabajo fueron empleadas técnicas de rutina (IDD, CIE y SN), se pudo demostrar la existencia de fuertes asociaciones antigénicas entre muestras de diverso origen, aún entre aquellas que como la 8 y la 9 pueden considerarse como serotipos diferentes y señalan la posibilidad de ciertas variaciones regionales. Los resultados obtenidos permiten recomendar el uso de cepas locales en la elaboración de inóculos con fines "vacunales" y evitar la introducción de "vacunas" foráneas, que además de no asegurar la protección inmune, agregarían el potencial riesgo de la introducción de variantes antigénicas poco deseables para los animales no vacunados y expuestos a ellas.

SUMMARY

The antigenic relationships among 16 contagious ecthyma (CE) (ORF) isolates were examined by double-immunodiffusion (AID), countercurrent immunoelectrophoresis (CIE) and culture neutralization test (CN). Samples were obtained from different parts of Mexico, between 1979-1984, from clinical cases in sheep and goats. The diagnosis was confirmed by electron microscopy in all cases.

The tests were performed using convalescent lamb, sheep and concentrated goat sera, and a rabbit hyperimmune serum. The antigens were prepared from infected scabs grounded in a sterile mortar. The suspensions were centrifuged at 1000-1200 xg for 10 minutes at room temperature and supernatants were used as antigen.

Concentrated (dialysed) goat and sheep convalescent sera failed to produce the reaction with CE antigens in AID and CIE. All the isolates produced one precipitate lines with rabbit and lamb sera. The precipitation lines developed in all cases were found identical, except between two of them with partial identity. These isolates, a sheep and a goat isolate, investigated by culture neutralization test, in PK15 cells, with rabbit serum, appeared to be two different serotypes.

LITERATURA CITADA

BUDDLE, B.M., DELLERS, R., and SCHURIG, G., 1984a. Heterogeneity of contagious ecthyma virus isolates. *Am. J. Vet. Res.* 45: 75.

BUDDLE, B.M., DELLERS, R. and SCHURIG, G., 1984b. Contagious ecthyma virus vaccination failures. *Am. J. Vet. Res.* 45: 263.

CARPUSO, A., TRABALLESI, B. and GUARINO, C. 1976. La prova di IDD nella diagnosi di ectima contagioso. *Atti 30 Conv. Naz. Soc. Ital. Sci. Vet.* XXX: 675.

- CERVANTES, R., 1983. Studies on antigens of *Aspergillus*. Their use in veterinary mycology. Tesis de Doctorado Universidad de Glasgow.
- GASSMANN, U., WYLER, R. and WITTEK, R., 1985. Analysis of parapoxvirus genomes. *Arch. Virol.* 83:17.
- JAWETZ, E., MELNICK, J.L. and ADELBERG, E.A., 1973. Manual de Microbiología Médica, 5ta. edición, Manual Moderno, México, D. F. p. 385.
- MATTHEWS, R.E.F., 1979. Classification and nomenclature of viruses. Third report of the International Committee on Taxonomy of viruses. *Intervirology*. 12: 132.
- PAPADOPOULOS, O.A., DAWSON, P., HUCK, R., and STUART, P. 1968. Agar gel diffusion studies of paravaccinia viruses. *J. Comp. Path.* 78:219.
- PRECAUSTA, P. and STELLMANN, C., 1974. Ecthyma contagieux du mouton. Comparaison "in vitro" de cinq souches. *Rev. Méd. Vét.* 125: 679.
- PURAN CHAND, V.D., RAO, V.D., CARG, S.K., SINGH, I.P. and CHANDRA, R. 1985. Counter-immunoelectrophoresis for rapid diagnosis of sheep pox. *Br. vet. J.* 141:124.
- RAFII, F. and BURGER, D., 1985. Comparison of contagious ecthyma virus genomes by restriction endonucleases. *Arch. Virol.* 84:283.
- ROBINSON, A.J. and BALASSU, T. 1981. Contagious pustular dermatitis (ORF). *Vet. Bull.* 51:771.
- ROBINSON, A.J., ELLIS, G. and BALASSU, T., 1982. The genome of ORF virus: Restriction endonuclease analysis of viral DNA isolated from lesions of ORF in sheep. *Arch. Virol.* 71:43.
- ROMERO-MERCADO, C.H., McPHERSON, E.A., LAING, A., LAWSON, J. and SCOTT, G. 1973. Virus particles and antigens in experimental ORF scabs. *Arch. Ges. Virusforsch.* 40:152.
- SAWHNEY, A.N. 1966a. Studies on the virus of ecthyma contagiosum. III Multiplicity of virus strains. *Acad. Bulgare Sci. Bull. Inst. Microbiol.* 18:179.
- SAWHNEY, A.N. 1966b. Studies on the virus of ecthyma contagiosum. IV A comparative study of different strains of the virus in the tissue culture. *Acad. Bulgare Sci. Bull. Inst. Microbiol.* 18:185.
- SAWHNEY, A.N., DUBEY, S. and MALIK, B., 1973. Diagnosis of contagious pustular dermatitis in sheep and goats by agar-gel precipitation test. *Indian Vet. J.* 50:605.
- TORRES, J., TORTORA, J., HERNANDEZ, M., MOLINA, F. y HERNANDEZ, E. 1982. Efecto citopático del virus de ecthyma contagioso en cultivos primarios de células de piel y riñón ovino y caprino. XIII Cong. Nal. Microbiol. 3:224. Guanajuato, Méx.
- TORTORA, J., TORRES, J., MOLINA, F., HERNANDEZ, M. y HERNANDEZ, E. 1982. Estudio comparativo de 10 muestras de ecthyma contagioso (ORF). Reunión Invest. Pecuaria México UNAM-INIP. p. 28.
- TORTORA, J., 1985. Ecthyma contagioso en ovinos y caprinos. Tesis de Maestría, FES-Cuautitlán-UNAM.
- WITTEK, R., HERLYN, M., SCHUMPERLI, D., BACHMANN, P., MAYR, A. and WYLER, R. 1980. Genetic and antigenic heterogeneity of different parapoxvirus strains. *Intervirology*. 13:33.